

„Charakterystyka białka opiekuńczego ClpB (Hsp100) pochodzącego z patogennej bakterii *Leptospira interrogans*, etiologicznego czynnika leptospirozy”

Joanna Krajewska

Bakteryjne białko opiekuńcze ClpB, należące do rodziny białek szoku termicznego Hsp100, jest ATPazą AAA+ (ang. *ATPases associated with a variety of cellular activities*), która współpracuje z białkami opiekuńczymi DnaK/DnaJ/GrpE (KJE) tworząc tzw. system bi-chaperonowy. System ten uczestniczy w procesach dezagregacji i reaktywacji zagregowanych białek, które powstają na skutek działania różnych czynników stresogennych.

Podstawową jednostką funkcjonalną białka ClpB jest heksamer w kształcie pierścienia ze środkowym kanałem, w którym dochodzi do ekstrakcji z agregatów białkowych pojedynczych, rozwiniętych polipeptydów. Każdy monomer ClpB składa się z domeny N-końcowej (ang. *N-terminal Domain*, ND) odpowiedzialnej za wiązanie substratu, dwóch domen wiążących ATP (ang. *Nucleotide Binding Domain 1, 2*; NBD-1, NBD-2) oraz domeny środkowej tzw. *coiled-coil* (ang. *Middle Domain*, MD), niezbędnej m.in. do oddziaływania z białkiem DnaK. W obrębie obu domen NBD można wyróżnić zachowane ewolucyjnie motywy charakterystyczne dla ATPaz AAA+, a mianowicie: Walker A (GX₄GKT/S), Walker B (hy₄DE), sensor 1 (N/T), sensor 2 (GAR) oraz palce argininowe koordynujące wiązanie i hydrolizę ATP.

Od ponad dekady liczne zespoły badawcze poszukują związku pomiędzy wirulencją patogenów bakteryjnych a działaniem białka ClpB. Dotychczas wykazano, że ClpB jest niezbędne w wirulencji takich patogenów jak: *Mycoplasma pneumoniae*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Listeria monocytogenes*, *Frascinella tularensis* oraz *Leptospira interrogans* [1]. Wykorzystując zwierzęta doświadczalne wykazano, że bakterie *L. monocytogenes* i *L. interrogans* pozbawione aktywnego białka ClpB tracą zjadliwość. Ponadto brak funkcjonalnego białka ClpB w komórkach *L. interrogans* był przyczyną zahamowania wzrostu krętków w warunkach stresu termicznego i oksydacyjnego. Stwierdzono również, że białko ClpB pochodzące z bakterii *F. tularensis* oraz *M. pneumoniae* wykazuje właściwości immunogenne. Z kolei ekspresja genu *clpB* *E. chaffeensis* nasilała się podczas infekcji linii komórkowej makrofagów. Powyższe obserwacje ujawniły negatywny aspekt funkcjonowania białka opiekuńczego ClpB w komórce (ang. *chaperone-linked negative side effect*), pokazując, że białko to jest nie tylko produkowane podczas infekcji gospodarza, a również może uczestniczyć w tym procesie [1]. Przypuszcza się, że niezdolność mutantów $\Delta clpB$ patogennej bakterii do namnażania się i zaindukowania objawów chorobowych

u zwierząt laboratoryjnych jest konsekwencją obniżonego poziomu pewnych białek będących substratami ClpB, które z kolei odgrywają istotną rolę w przeżywalności patogenów. Wobec tego, białko ClpB umożliwiałoby patogennym bakteriom przystosowanie się do warunków panujących wewnątrz komórek gospodarza oraz realizację poszczególnych etapów infekcji, zapewniając im zarówno przeżywalność, jak i indukcję objawów choroby.

To właśnie do tego nowego aspektu działania białka ClpB nawiązuje prezentowana praca doktorska, w której skupiono się na badaniu funkcji biologicznej ClpB z patogennej bakterii *Leptospira interrogans* (ClpB_{Li}), głównego czynnika etiologicznego wywołującego leptospirozę u ludzi i zwierząt. Leptospiroza jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych zoonoz na świecie. Każdego roku dochodzi do ponad miliona zakażeń ludzi tą jednostką chorobową ze wskaźnikiem śmiertelności sięgającym nawet do 20%. Wysoki współczynnik śmiertelności z powodu leptospirozy występuje głównie w obszarach tropikalnych oraz zalewowych, co związane jest ze słabo rozwiniętą służbą zdrowia. Ponadto zapadalność na tę chorobę jest większa w ciepłym klimacie z uwagi na dłuższą przeżywalność leptospir poza organizmem gospodarza. Bakterie *Leptospira* spp. kolonizują kanaliki nerkowe zarażonych zwierząt i wraz z ich moczem przedostają się do środowiska zewnętrznego, prowadząc do kontaminacji gleby oraz wód powierzchniowych. Nosicielami leptospir są przede wszystkim gryzonie i małe torbacze, ale mogą być nimi także zwierzęta hodowlane i domowe, w tym bydło, trzoda chlewna, konie, owce, psy. Zakażenie leptospirami następuje poprzez bezpośredni lub pośredni kontakt z moczem zakażonych zwierząt. Do zakażenia dochodzi najczęściej poprzez zranioną skórę oraz błony śluzowe. Transmisja bakterii z człowieka na człowieka zachodzi stosunkowo rzadko. W grupie podwyższonego ryzyka zakażeń leptospirami znajdują się osoby, które na co dzień mają styczność ze zwierzętami, tj. rolnicy, hodowcy, leśnicy, weterynarze. Choroba ta w łagodnej fazie objawia się symptomami grypopodobnymi, zaś w ostrej (zwanej chorobą Weil'a) dochodzi do poważnych uszkodzeń nerek, wątroby, a także płuc, co w ostateczności prowadzi do śmierci pacjenta. Warto również nadmienić, że obecnie leptospiroza stanowi bardzo poważny problem ekonomiczny w sektorze rolnictwa, głównie z uwagi na obniżenie produkcji mleka u bydła, dużo częstsze poronienia, wady rozwojowe płodów oraz straty w populacji zwierząt hodowlanych.

Wyniki zespołu francuskiego, opublikowane w 2011 roku i przytoczone powyżej¹, świadczące m.in. o udziale białka ClpB w wirulencji bakterii *L. interrogans*, miały kluczowe znaczenie dla sformułowania problemu badawczego prezentowanej pracy doktorskiej. Wówczas nie podjęto próby opisu właściwości ClpB *L. interrogans* (ClpB_{Li}), które pozwoliłyby na powiązanie jego specyficznej roli podczas infekcji powodowanych przez *Leptospira* z funkcją białka opiekuńczego oraz jego zaangażowaniem w procesy dezagregacji i reaktywacji agregatów białkowych. Dlatego też głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było scharakteryzowanie wybranych właściwości białka ClpB_{Li}.

Badania rozpoczęto od przeprowadzenia analizy porównawczej sekwencji aminokwasowych białek ClpB_{Li} i dobrze scharakteryzowanego białka ClpB z modelowego mikroorganizmu *Escherichia coli* (ClpB_{Ec}), wykorzystując program Clustal. Gen *clpB_{Li}* koduje białko zbudowane z 860 reszt aminokwasowych i o masie cząsteczkowej 96,33 kDa. Na podstawie przeprowadzonych analiz bioinformatycznych stwierdzono, że ClpB_{Li}, podobnie jak ClpB_{Ec}, wykazuje organizację wielodomenową i zbudowane jest z domeny N-końcowej (ND_{1-145aa}), dwóch domen wiążących ATP (NBD-1_{161-342aa}, NBD-2_{560-768aa}) oraz domeny środkowej (MD_{393-527aa}) [2]. Identyczność reszt aminokwasowych w obrębie pełnej sekwencji obu białek wynosi jednak zaledwie 52% (27,7% w obrębie ND; 45,3% w obrębie MD; 72% w obrębie NBD-1 i 65,7% w obrębie NBD-2), a stosunkowo wysoki stopień wzajemnego pokrycia sekwencji domen NBD białek ClpB_{Li} i ClpB_{Ec} świadczy o obecności w ich sekwencji zachowanych ewolucyjnie motywów [1].

Następnie skonstruowano plazmid, zapewniający wydajną produkcję białka ClpB_{Li} w systemie bakteryjnym *E. coli* z zastosowaniem wektora ekspresyjnego pET28b(+) i opracowano efektywną, dwuetapową procedurę jego oczyszczania [2]. W tym celu wykorzystano chromatografię metalopowinowactwa (ang. *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) na złożu agarozowym ze związanymi kowalencyjnie jonami niklu (Ni²⁺-NTA) oraz filtrację żelową na złożu Superdex 200. Ostatecznie uzyskano preparat rekombinowanego białka ClpB_{Li}, co potwierdzono analizą LC-MS-MS/MS (ang. *Liquid Chromatography-tandem Mass*

¹K. Lourdault, G.M. Cerqueira, E.A. Wunder Jr., and M. Picardeau (2011) Inactivation of *clpB* in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. *Infect. Immun.* 79: 3711-3717.

Spectrometry) [2]. Oczyszczone białko ClpB_{Li} wykorzystano do dalszych analiz [2, 3]. W pierwszej kolejności, stosując metodę Western blotting oraz test immunoenzymatyczny (ELISA, ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), zbadano immunoreaktywność białka ClpB_{Li} z surowicami pochodzącymi od bydła i królików, eksperymentalnie zakażonych wybranym szczepem *Leptospira* spp. Jako próby kontrolne wykorzystano surowice pochodzące od zdrowych zwierząt. Stwierdzono, że infekcja wywoływana przez leptospiry indukuje odpowiedź humoralną układu immunologicznego gospodarza, o czym świadczy podwyższony poziom swoistych przeciwciał anti-ClpB_{Li} klasy IgG w surowicach zwierząt zakażonych *Leptospira*. Dodatkowo wykorzystując specyficzne przeciwciała anti-ClpB_{Li158-334} zidentyfikowano ClpB_{Li} w tkance nerek chomików zakażonych *L. interrogans*, co świadczy o produkcji ClpB_{Li} podczas infekcji gospodarza. Wyniki te wskazują na udział ClpB_{Li} w wirulencji *L. interrogans* [2].

W kolejnym etapie pracy dokonano analizy struktury II-rzędowej oraz stabilności termicznej ClpB_{Li} z zastosowaniem metody spektroskopii dichroizmu kołowego (ang. *Circular Dichroism*, CD) [3]. Stwierdzono, że struktura ClpB_{Li} składa się głównie z α -helis, co jest zgodne z danymi uzyskanymi wcześniej dla białka ClpB_{Ec}. Dodatkowo na podstawie zbioru widm CD wyznaczono temperaturę topnienia (T_m) badanego białka, która wynosiła ok. 67 °C. Wysoka wartość T_m świadczy o dużej stabilności termicznej struktury ClpB_{Li}.

W następnej kolejności zbadano zdolność ClpB_{Li} do samoasocjacji w obecności nukleotydów, ADP i analogów ATP, tj. ATP γ S i AMP-PNP, oraz bez ich udziału, a także w buforze o niskiej sile jonowej [3]. Wykorzystując analityczne ultrawirowanie oraz pomiar prędkości sedymentacji stwierdzono, że w obecności niehydrolizowalnego analogu ATP, tj. ATP γ S, dochodzi do pełnej oligomeryzacji ClpB_{Li}, a zatem do powstania heksamerów. Obecność ADP również zainicjowała proces samoasocjacji ClpB_{Li}, jednak w tym przypadku nie dochodziło do powstania heksamerów. Białko ClpB_{Li} w układzie bez nukleotydu oraz w obecności AMP-PNP, a także w buforze o niskiej sile jonowej występowało głównie w formie monomerów. Przeanalizowano także wpływ wyżej wymienionych nukleotydów na konformację ClpB_{Li} przeprowadzając ograniczone trawienie tego białka trypsyną [3]. W doświadczeniu tym wykorzystano także ClpB_{Ec} jako białko kontrolne. Zaobserwowano, że obecność nukleotydów: ATP, ATP γ S, AMP-PNP i ADP w różnym stopniu chroniła białka ClpB_{Li} i ClpB_{Ec} przed proteolitycznym działaniem trypsyny, zaś trawienie obu białek bez udziału nukleotydu postępowało w czasie. Na podstawie tych obserwacji stwierdzono, że wiązanie nukleotydu

indukuje zmiany konformacyjne w białkach ClpB. Należy jednak podkreślić, że w obecności zarówno ATP γ S, jak i ADP białko ClpB_{Li} było bardziej odporne na atak proteolityczny trypsyny niż ClpB_{Ec}. Oznacza to, że nukleotydy ATP γ S i ADP skuteczniej stabilizują oligomery ClpB_{Li} niż ClpB_{Ec}. Podsumowując, oporność ClpB_{Li} na działanie trypsyny w obecności różnych nukleotydów pokrywa się ze zdolnością tego białka do tworzenia form oligomerycznych. Proces oligomeryzacji inicjowany w obecności nukleotydu jest istotny dla funkcji biologicznej białka ClpB i jego zaangażowania w procesy dezagregacji i reaktywacji agregatów białkowych [3].

Kolejnym zadaniem było oznaczenie podstawowej aktywności ATPazowej białka ClpB_{Li} oraz zbadanie wpływu na tę aktywność niestrukturalnych polipeptydów (κ -kazeiny i polilizyny), a także zagregowanego substratu dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PDH) [3]. Stwierdzono, że ClpB_{Li} wykazuje nieznacznie niższą aktywność ATPazową w porównaniu z ATPazą ClpB_{Ec}. Ponadto aktywność ATPazy ClpB_{Li}, podobnie jak aktywność ATPazy ClpB_{Ec}, jest stymulowana przez κ -kazeinę i polilizynę, natomiast obecność zagregowanego substratu, G6PDH, nie miała znaczącego wpływu na aktywność ATPaz ClpB_{Li} i ClpB_{Ec} [3].

Następnie zbadano aktywność dezagregacyjną ClpB_{Li}, w układzie *in vitro*, w obecności systemu opiekuńczego DnaK/DnaJ/GrpE z *E. coli* oraz bez jego udziału [3]. W tym celu wykorzystano znany substrat modelowy białka ClpB_{Ec}, tj. zdenaturowaną chemicznie i termicznie G6PDH oraz dwa nowe substraty, zagregowaną termicznie FBP aldolazę (Fda) oraz ciała inkluzyjne VP1- β -galaktozydazy izolowane z komórek *E. coli*. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że ClpB_{Li} efektywniej reaktywuje agregaty białkowe bez udziału KJE w porównaniu z białkiem ClpB_{Ec}, oraz że obecność białek KJE nie wpłynęła istotnie na aktywność dezagregazy ClpB_{Li}, tak jak w przypadku ClpB_{Ec}. Powyższe obserwacje wykazały, że ClpB_{Li}, w przeciwieństwie do białka ClpB_{Ec}, może działać w przypadku niektórych substratów niezależnie od systemu białek KJE [3].

Ponadto zbadano aktywność dezagregacyjną ClpB_{Li} w bakteriach *E. coli* MC4100 $\Delta clpB$ [3]. Z dostępnych danych literaturowych wynika, że brak funkcjonalnego białka ClpB_{Ec} skutkuje wolniejszym tempem wzrostu bakterii w temperaturze 45 °C i znacznie obniżoną ich przeżywalnością w warunkach ekstremalnego szoku termicznego (50 °C). W związku z tym sprawdzono, czy białko ClpB_{Li} jest w stanie funkcjonalnie zastąpić ClpB_{Ec}, wykorzystując test komplementacji. W tym celu sklonowano gen *clpB_{Li}* w niskokopijnym wektorze pGB2, zrekombinowany plazmid wprowadzono do komórek mutantu *E. coli* MC4100 $\Delta clpB$ i

przeanalizowano ich wzrost (w 45 °C) oraz przeżywalność (w 50 °C). Zaobserwowano, że gen *clpB_{Li}* nie znosi efektu mutacji $\Delta clpB$, ponieważ: (1) bakterie syntetyzujące białko ClpB_{Li} wykazywały wolniejsze tempo wzrostu w temp. 45 °C; (2) w warunkach ekstremalnego szoku termicznego ClpB_{Li} nie umożliwiło wzrostu bakteriom *E. coli* MC4100 $\Delta clpB$. Wobec tego stwierdzono, że ClpB_{Li} nie jest w stanie funkcjonalnie zastąpić białka ClpB_{Ec}, prawdopodobnie ze względu na brak współpracy z systemem chaperonowym KJE z *E. coli*, spowodowany utratą oddziaływań pomiędzy domeną MD białka ClpB_{Li} i DnaK z *E. coli* [3]. Wynik tego doświadczenia podkreśla specyficzność gatunkową białek opiekuńczych.

Kolejnym zadaniem badawczym było sprawdzenie wpływu nukleotydów (ATP i ATP γ S) na oddziaływanie ClpB_{Li} ze zagregowanym substratem, G6PDH [3]. Wiadomo, że ATP γ S wiąże się do domen NBD białka ClpB, ale nie ulega hydrolizie, wprowadzając w ten sposób białko w „stan zamrożenia” (ang. *frozen state*). Uzyskane wyniki wykazały, że obecność nukleotydu zmienia powinowactwo ClpB_{Li} do zagregowanego substratu, oraz że ClpB_{Li} efektywniej oddziałuje z substratem w obecności ATP γ S. Z kolei w obecności ATP „układ ClpB_{Li}-substrat” jest bardziej dynamiczny, ponieważ dochodzi wówczas do hydrolizy ATP i reaktywacji G6PDH. W tych warunkach ClpB_{Li} przejawia mniejszą zdolność do stabilnego wiązania agregatu [3].

W skład omawianej pracy doktorskiej wchodzi również wstępna identyfikacja potencjalnych fizjologicznych substratów białka ClpB_{Li} z lizatów leptospir traktowanych czynnikami stresowymi (37 °C, 4 godz.; 42 °C, 2 godz.). Aby osiągnąć ten cel niezbędna była konstrukcja plazmidu niosącego gen *clpB_{Li}* z dwiema punktowymi mutacjami wprowadzonymi w obrębie NBD-1 i NBD-2 [4]. Z danych literaturowych wynika, że zamiana reszty kwasu glutaminowego na resztę alaniny w obrębie motywu Walker B białka ClpB, który znajduje się w NBD-1 i NBD-2, skutkuje wiązaniem ATP, lecz nie jego hydrolizą. Ten wariant białka ClpB działa jak swoista „pułapka na substraty” w obecności ATP (ang. *substrate trap*), ponieważ trwale wiąże białka oddziałujące z ClpB. Wykorzystując oczyszczone białko ClpB_{Li}-Trap (E281A/E683A) i lizaty *L. interrogans* oraz metody *pull-down*, LC-MS-MS/MS i analizy bioinformatyczne zidentyfikowano 68 potencjalnych białek tworzących kompleksy z ClpB_{Li}. Większość zidentyfikowanych białek pełni kluczową rolę w głównych szlakach metabolicznych komórki bakteryjnej, takich jak: glikoliza/ glukoneogeneza, cykl Krebsa, biosynteza aminokwasów, metabolizm kwasów tłuszczowych. Na tej podstawie zaproponowano, że substratami dla ClpB_{Li} są przede wszystkim kluczowe enzymy metaboliczne. Ponadto niektóre z wytypowanych białek

powiązane są z innymi istotnymi procesami komórkowymi, jak: biogeneza rybosomów, translacja, transkrypcja czy chemotaksja [4]. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że zidentyfikowane enzymy mają istotny wpływ na wzrost i na patogenność leptospir. Wobec tego zaproponowano, że rola białka ClpB_{Li} w wirulencji leptospir polega na ochronie aktywności tych enzymów oraz kontrolowaniu metabolizmu komórki *Leptospira* w warunkach stresowych.

Podsumowując, w ramach tej pracy doktorskiej, dokonano pierwszej tak szczegółowej charakterystyki właściwości białka opiekuńczego ClpB_{Li} pochodzącego z patogennych krętków - bakterii o wciąż słabo poznanej biologii. Uzyskane wyniki sugerują, że ClpB jest syntetyzowane podczas infekcji i indukuje humoralną odpowiedź immunologiczną ustroju gospodarza. Ponadto wykazano, że ClpB_{Li} tworzy heksameryczne struktury stabilizowane w obecności nukleotydu oraz oddziałuje z agregatami białkowymi w stanie związania z ATP (ang. *ATP-bound state*). Cennym odkryciem jest to, że ClpB_{Li} posiada niezależną od systemu KJE aktywność dezagregazy, która prawdopodobnie przyczynia się do zaadaptowania leptospir w zmiennych warunkach panujących wewnątrz komórek gospodarza. Przeprowadzona charakterystyka strukturalna i biochemiczna białka ClpB_{Li} oraz analizy proteomiczne dostarczyły dodatkowych informacji, które przybliżają rolę tego białka w wirulencji leptospir oraz w patogenezie leptospirozy, a także otwierają nowe możliwości dążeniom, zmierzającym do opracowania w przyszłości bardziej skutecznych terapii antybakteryjnych.

Literatura:

- [1] **Krajewska J.**, Kędzierska-Mieszkowska S. (2014) AAA+ ClpB chaperone as a potential virulence factor of pathogenic microorganisms: Other aspect of its chaperone function. *Adv in Biosci and Biotech* 5: 31-35.
- [2] **Krajewska J.**, Arent Z., Więckowski D., Zolkiewski M., Kędzierska-Mieszkowska S. (2016) Immunoreactivity of the AAA+ chaperone ClpB from *Leptospira interrogans* with sera from *Leptospira*-infected animals. *BMC Microbiology* 16:151.
- [3] **Krajewska J.**, Modrak-Wójcik A., Arent Z. J., Więckowski D., Zolkiewski M., Bzowska A., Kędzierska-Mieszkowska S. (2017) Characterization of the molecular chaperone ClpB from the pathogenic spirochaete *Leptospira interrogans*. *PLoS One* 12: e0181118.

[4] **Krajewska J.**, Arent Z., Zolkiewski M., Kędzińska-Mieszkowska S. (2018) Isolation and identification of putative protein substrates of the AAA+ molecular chaperone ClpB from the pathogenic spirochaete *Leptospira interrogans*. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 1234.